

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-56244

(P2000-56244A)

(43) 公開日 平成12年2月25日 (2000.2.25)

| | | | |
|---------------------------|------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード (参考) |
| G 0 2 B 26/08 | | G 0 2 B 26/08 | E |
| 21/00 | | 21/00 | |
| 21/16 | | 21/16 | |

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 10 頁)

| | | | |
|--------------|------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平11-211974 | (71) 出願人 | 396000455 カール ツァイス イエナ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ D-07745 イエナ タッツェン ドブルムナーデ 1 a |
| (22) 出願日 | 平成11年7月27日 (1999.7.27) | (74) 代理人 | 100071098 弁理士 松田 省躬 |
| (31) 優先権主張番号 | 1 9 8 3 5 0 7 2 . 4 | | |
| (32) 優先日 | 平成10年8月4日 (1998.8.4) | | |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (DE) | | |

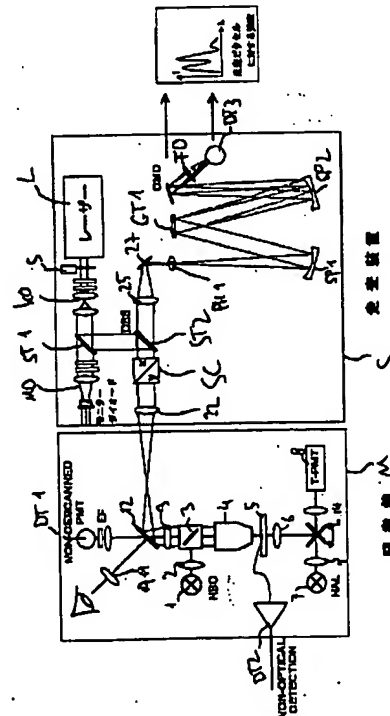
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザ走査顕微鏡および照明およびまたは検出装置

(57) 【要約】

【課題】 鏡アレー励起と検出の両方または一方に関して本質的に融通性のあるレーザ走査顕微鏡およびその配列

【解決手段】 モノクロメーター内へ組み込まれた切り替え鏡アレーを通じて、そのスペクトル特性が自由にプログラム可能な検出ユニットを配列



【特許請求の範囲】

【請求項1】反射、蛍光のような、分散しながら分割される照明と対象物からの光との両方または一方を波長選択するための、照明と検出光程との両方または一方内に、選択的に切り替え可能な少なくとも1基の微小鏡配列(DMD)をもつレーザー走査顕微鏡。

【請求項2】顕微鏡において、対象物の方向へ照明光を波長選択しながら接続し、検出の方向へ対象物の光を波長選択しながら切り替えるための、少なくとも1基のDMD配列と少なくとも1基の分散素子の組み合わせ。

【請求項3】レーザー走査顕微鏡へ利用する請求項2に記載の組み合わせ。

【請求項4】分散素子が、少なくとも1基の格子とプリズムとの両方または一方である、請求項1から3の1つに記載の配列。

【請求項5】レーザー走査顕微鏡の検出光程内の共焦点孔形状としてのDMD配列またはLCD配列の組合せ。

【請求項6】検出光程を個別チャンネルへ分割するためのダイクロイック・ビームスプリッターをもつレーザー走査顕微鏡の検出光程への請求項1から5の1つに記載の配列の光学接続。

【請求項7】光学接続が光ファイバーを通じて行われる、請求項6に記載の配列。

【請求項8】少なくとも1基のDMD配列を切り替えることによって作り出される、少なくとも1つの方向へのスリット形走査をもつレーザー走査顕微鏡。

【請求項9】少なくとも1基の分散素子と、検出光程内に選択的に切り替え可能な送信絞りとの組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明はレーザーユニット、走査手段、顕微鏡架台、検出ユニット、駆動・撮像ユニットから成るレーザー走査顕微鏡を記述しており、ここで検出ユニットのスペクトル特性が、モノクロメーター内へ組み込まれた切り替え鏡アレーを通じて自由にプログラム可能である。この切り替え鏡アレー(1次元または2次元)は規範的にはDMDとして仕上げる事ができる(デジタルミラーデバイス)。この発明に従うレーザー走査顕微鏡ではさまざまな運用モードが認容される。1つのモードでは走査された画素(試料内の)ごとに、放出されたスペクトルが高精度で検出でき;他のモードでは放出されたスペクトルが多数のスペクトル部分へ分解でき(切り替え鏡アレー上のゾーン)、これらの部分ごとに別々の電子光学的検出チャンネルとして扱うことができる(このことはたとえば多重蛍光体を撮像するのに有利である)。さらに、対象物平面と共役な平面内へ配した他の切り替え鏡アレーを介して、自由にプログラム可能な共焦点絞り(ピンホール)が実現できる

【0002】

【従来の技術】(蛍光体)試料検査用のレーザー走査顕微鏡は一般に検出ユニットから成り、検出ユニットがプレバートから放出される放射(蛍光放射)をダイクロイック・スプリッター層およびフィルター層を介して、ある数(ふつう4つまで)の検出チャンネルへ分割する(「光学的多重チャンネル解析、OMA」の原理)。このスプリッターやフィルターは通常、回転可能なレボルバー輪または直線的に押し動かせるスライダ内に取り付けられている。これによってある程度までは、試料放射のスペクトル特性へチャンネルがスペクトル的に適応することが可能である。しかし取り付け具にはそれぞれ限られた数の誘電スプリッターやフィルターしか受け入れできず、個々のスプリッターやフィルターのスペクトル特性はそれぞれ製造工程中に決定されているので、この配列は、試料スペクトルへ最適に適応するには、多くの利用形態で十分な融通性がない(図1)。US特許5587832には照明と検出の両方または一方のためのDMD鏡アレーをもつ共焦点顕微鏡が記述されている。	

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、鏡アレー励起と検出の両方または一方に関して本質的に融通性のあるレーザー走査顕微鏡である。	

【0004】

【課題を解決するための手段】この発明は、モノクロメーター内へ組み込まれた切り替え鏡アレーを通じて、そのスペクトル特性が自由にプログラム可能な検出ユニットをもつ、レーザー走査顕微鏡を記述している。この発明に従うレーザー走査顕微鏡は、レーザーユニット、走査手段、顕微鏡架台、検出ユニット、駆動・撮像ユニットから成る。試料から放出される(蛍光)放射は(共焦点使用の場合)、対象物と共役な平面内に位置する共焦点ピンホール上へ焦点を結ぶ。このピンホールは同時に(格子)モノクロメーターの入射開口部でもあり、モノクロメーターはその分散作用によって試料放射をそのスペクトル成分へ分割する。分散媒質(格子)の焦点平面内には少なくとも1次元の切り替え鏡アレーがあり、これの上へ試料スペクトルが光学的に結像される(図2)。	

【0005】この少なくとも1次元の切り替え鏡アレーは個別に駆動可能な多数の切り替え鏡から成る。走査手段が本質的に試料点の上に留まる間、たとえば逐次的に鏡が1つずつ個別に駆動(そしてこれによって切り替え)できる。こうして試料放射の個々のスペクトル成分が逐次的に、全スペクトルを撮像するために、適合して同期を取った検出器上に反射像を結ぶ。	

【0006】別の方法では全スペクトル帯に対応する隣接鏡域を併行して駆動し、この方法で全周波数帯を、次々と、またはいくつかの帯域を同時に検出器へ入れるよ

うにできる。蛍光放射の場合にはこのとき励起放射に対応する反射像画素を、検出されたスペクトルの中で余白としておくのが有利である。	

【0007】方法の変形としては励起に対応する反射像画素を通じて、励起放射を系へ結合するのが有利である(図3ab)。これによって主ビームスプリッター(DBS)の必要性が避けられ、このようにはっきりとコンパクトなシステム構成が実現可能である。このため励起放射がこの場合自動的に「検出」ピンホールを「照明」ピンホールとして通過し、このことが光線品質を改善し(空間フィルタリング)、それによって全顕微鏡系の空間解像度をより良くする。このため、励起放射が反射入射するために利用される鏡が、可能な2つの鏡位置の間で振動することによって、照明強度が準連続的に調整でき、もしくは走査画素同期を変更することができる(シェーディング補償、強度変調等)。	

【0008】さらに、対象物平面と共役な平面内へ配した他の切り替え鏡アレーを介して、自由にプログラム可能な共焦点絞り(ピンホール)が実現可能である(図4)。このピンホールは形と大きさ(調整可能な共焦点体積)についても、水平位置についても自由にプログラム可能で、このことが系の柔軟性を高め、光学系の調整について大きな長所となる(ピンホール自動調整)。そのうえ「多チャンネル」使用の際、ピンホールサイズが、検出にかかるスペクトル帯と瞬間的に同期され、共焦点顕微鏡との波長によらない光学的インターフェースを実現できる。そのうえ、さまざまな非常に異なる強力な蛍光が同時に試料中に存在し検出されるなら、ピンホールサイズも蛍光放射強度に適應しているのが有利である。

【0009】方法の有利な1変形としては、湾曲した格子を装入でき、このことが、検出すべき放射の視準と分散との両方を引き受け、それによって結果的に光学部品の数を少なくできる(図5)。これによってこの発明に従う全配置の構成の大きさを小さくできるのが有利な点である。このことから特に、検出系の光学安定性が結果的により高くなる。	

【0010】方法の1変形として、光学格子をプリズムで置き換えることができる。これによって潜在的に、特に非偏光を検出するとき光学系の効率を高めることが可能である(図6)。	

【0011】方法の1変形としてこの発明に従う分光系は、従来のレーザー走査顕微鏡にも適應させて、顕微鏡試料の放出放射のスペクトルを特徴づけるようにすることができる。これは特に、分光ユニットをレーザー走査顕微鏡へファイバー結合させることを通じて行うことができ、ここでファイバーは直接共焦点ピンホールのうちの1つの後ろに配するのが良い(図7)。	

【0012】方法の1変形として、多光子蛍光を対象として励起する方法では、励起の3D位置解像度が良いた

め共焦点絞りを不要とできる(図8)。この場合この発明に従う配列では、共焦点絞りがモノクロメーター入射絞り平面内から除かれ、放出光が直接分散媒質の上へ入射できる。	

【0013】生薬学分野の蛍光顕微鏡内では、一般に約350ないし800nmの波長帯への使用が集中する。応用面で要求される波長解像度は約0.5nmの範囲である。切り替え鏡アレーは今日さまざまな使用形態のものが(商業ベースでも)入手でき、たとえばテキサス州ダラス、テキサス器械有限会社製、あるいは「ディスプレイ型」576×864ピクセル²のものも入手できる。これによって、スペクトルを写像する際864ピクセルに沿って約0.5nmの解像度が実現される。個々の鏡はデジタル駆動されるとき、安定性の高い2つの位置の間で旋回し(±10°)、そのとき旋回が起きるのは約300ns以内に限定される。反射に用いる鏡は自由に、互いに独立にデジタルプログラム可能である。	

【0014】上に記した構成中分散媒質としては、たとえば格子、プリズムまたはこれらの組み合わせが装入できる。これらの部品を「ダブルパス」機器構成内に装入する際には、実際の分散は倍にでき、これによってレーザー走査顕微鏡のコンパクトな構成が実現できるのが有利な点である。原則としてここに記した配列はすべて、トランスミッション・アレー(LCDアレー;液晶)が切り替え鏡アレーの代わりに装入されることによって、トランスミッション・モード内でも実現可能である。	

【0015】レーザー光が線の形へ広げられ、これがスキャナー(1走査軸)のみを介して対象物を通じて導かれる(図10)ことによって、線走査するレーザー走査顕微鏡が実現できる。図2で点の形のピンホールを線の形のレーザー光線に沿ったスリットピンホールによって置き換え、DMDを2次元切り替え鏡アレーによって置き換え、検出器を(感度を増強した)CCDによって置き換えると、系は線走査モードで運用できる。DMDアレーの次元の中で走査された線が写像され、他の座標軸の中でこの対象線のスペクトルが写像される。光学格子を交換することによって、または格子(モノクロメーター大)を押し動かし回転させることによって、分光計システムの解像力はその時々に応用する必要性に適應することができる。	

【0016】

【発明の実施の形態】図1には顕微鏡ユニットMと走査中枢Sを図示しており、これらは中間写像を通じて共通の光学インターフェースを有し、LSMを形成している。走査中枢Sは直立顕微鏡の光電管にも、倒立顕微鏡の側方出力部にも取り付けることができる。旋回可能な鏡14を介して照明光走査と透過光走査の間で切り替え可能な顕微鏡光程を図示した。	

【0017】また、光源1、照明レンズ系2、ビームス

ブリッター3、対物レンズ4、試料ステージ5、集光レンズ6、光源7、受信機の配列8、円筒レンズ9、円筒レンズ10と接眼レンズ11とをもつ観測光程、走査光線を接続するためのビームスプリッター・鏡12を図示した。	

【0018】レーザーモジュール13.1、13.2がレーザーを収容し、単一モード光ファイバー14.1、14.2を通じて走査中核Sのレーザー接続ユニットと結合している。光ファイバー14.1、14.2の接続は、押して動かす視準レンズ系16と光線偏向素子17.1、17.2とを介して行われている。部分透過鏡18を介して監視光程がモニターダイオード19の方向へ引き出されており、モニターダイオードには、ここに示していないフィルターレボルバー輪の上に直線フィルター21とニュートラルフィルター20とをあらかじめ配しておくとう利である。	

【0019】走査ユニットそのものは走査対物レンズ22、X/Yスキャナー23、主ビームスプリッター24、検出チャンネル26.1—26.4について共通の結像レンズ系25から成る。結像レンズ系25の後ろにある偏向プリズム27が、対物レンズ5から来る放射を結像光学系25の収束光程内にあるダイクロイック・ビームスプリッター28の方向へ反射する。これらには光軸の方向とそれに垂直な方向へ調整可能で直径が可変な、検出チャンネルごとに個別のピンホール29と、検出フィルター30と、適合した受信素子31(PMT)とが後置されている。駆動ユニット・計算ユニット34が配備されており、これはとりわけステージ5、スキャナー23と結合し、それらを駆動する。	

【0020】図2はこの発明に従う、レーザーユニットLとそれに後置したシャッターS、視準レンズ系KO、モニター光程MOを分岐するためのビームスプリッターST1、走査手段SC内へ、もしくは検出の方向へ導入するためのビームスプリッターST2、図1に類似の顕微鏡と、鏡12がビームスプリッターとして作り上げられている、走査光程外に付加した検出DT1、検出ユニット、駆動・撮像ユニットから成るレーザー走査顕微鏡の可能な実行形を示す。	

【0021】試料から放出された放射は、(共焦点使用の場合)共役な対象物平面内に位置する共焦点ピンホールPH1上へ焦点を結ばせることができる。このピンホールPH1は同時に(規範的には「格子」GTと結像鏡SP1、SP2)モノクロメーターの入射開口部をなし、モノクロメーターがその分散作用によって試料放射をそのスペクトル成分へ分割する。分散媒質(規範的には「格子」)の焦点面には少なくとも1次元の切り替え鏡アレーDMD1があり、その上へ試料スペクトルが光学的に結像し、収束レンズ系FOと検出器DT3とが後置されている。	

【0022】有利な一実施法としては、励起に対応する

反射像画素を通じて励起放射をシステムへ接続するのが有利である。これによって主ビームスプリッター(DBS)の必要性が回避されてはつきりとコンパクトなシステム構成が実現できる。そのうえ励起放射がこの場合自動的に「検出」ピンホールを「照明」ピンホールとして通過し、このことは光線品質を改善し(空間フィルタリング)、それによって顕微鏡システム全体の空間解像度を改善する。そのうえ、励起放射を反射入射させるために使われる鏡が2つの可能な鏡位置の間で振動することによって、照明強度が準連続的に調整でき、もしくは走査・画素同調が変更できる(シェーディング補償、強度変調、その他)。	

【0023】図3aに光接続ファイバーFを図示した。接続されたレーザー光(入)は格子GT2に達し、スペクトル分割され、ここに分散方向に沿って伸びる矢印で示したようにDMD配列へ、平行光線にするための視野レンズFL1を通じて反射する。個々の鏡素子の接続を選択することによって、図3bに図示したとおり、ある決まった波長または波長領域(励起光)がオンの状態で格子の方向へはね返され、他の波長または波長領域は鏡のオフ状態で格子GT2へ帰らず、選択がなされる。

【0024】格子GT2へはね返された波長成分(励起光)について、分散が再びもちあがって、それが格子上の違う場所に当たるために、顕微鏡入力部内にあるピンホールPH2へ結像する(アウト・オン)。対象物から戻ってきた光はPH2、GT2、FL1、DMD、別の視野レンズFL2を通じて、図に示した検出ユニットDEの方向へ届く。オフ状態では検出の方向へ波長を選択して反射させる(アウト・オフ)。格子GT2では個々の波長に分割され、個々に検出することができる。	

【0025】図4に示すように、対象物平面に共役な平面内へ配された別の切り替え鏡アレーDMD1を介して、図2のPH1の代わりに自由にプログラム可能な共焦点絞り(ピンホール)を実現することができる。このピンホールは形と大きさ(調整可能な共焦点体積)ばかりでなく水平位置も自由にプログラム可能であり、このことが系の柔軟性を高め、光学系の調整に非常に有利である(ピンホール自動調整)。そのうえ「多チャンネル利用」の際には、ピンホールサイズがその瞬間検出にかかるスペクトル帯と同期して、波長によらない光学インターフェースを共焦点顕微鏡との間に実現することができる。そのうえ、さまざまな非常に異なる強力な蛍光が同時に試料内にあって検出されなければならないなら、ピンホールサイズも蛍光放射の強度に適応させることができるのが有利な点である。	

【0026】図5に示すように、方法の変形として、湾曲した格子GT3が装入でき、このことが検出すべき放射の視準と分散の両方を引き受け、それとともに図2の結像鏡SP1、SP2を削除することによって、結果的に光学部品の数がより少なくなる。これによってこの発

明に従う配列全体の構成規模が小さくなるという長所をもつ。このことから、特に検出系の光学的安定性がより高くなるという結果となる。	

【0027】図6では、光学格子は他の実行形で、プリズムPによって置き換えてある。これによって潜在的に、特に非偏光の検出の際には光学系の効率を高めることが可能である。	

【0028】図7には図1に類似の従来のレーザー走査顕微鏡を、ここでは参照記号なしに示す。レーザー走査顕微鏡へは別のファイバーF1を介して、たとえば図5に記したようなこの発明に従う分光学的検出システムの実行形の可能性を、ピンホール直後の検出光程の1つ(図1の26.1)から接続換えして、顕微鏡試料の放出放射を特徴づけるようにしたものである。	

【0029】図8では、多光子蛍光を励起する場合、この発明に従う配列では、共焦点絞り(図2のPH1、図4のDMD1)がモノクロメーター入射絞り平面内から除かれ、図5に従う湾曲鏡をもつ配列に基づき示されているように、放出光が直接に分散媒質上へ入射できる。	

【0030】図9は図2のような別の実行形を示しているが、しかしDMDの代わりに格子GT1の次に送信変調器MT、たとえばLCDアレーをもち、これが分散スペクトルの着目波長のみを検出器へ到達させる。図4のDMDに類似のピンホールの代わりに送信光程内にLCDアレーを作り上げることでもでき、有利である。	

【0031】図10は、レーザー光がたとえば円筒レンズによって線へ広げられ、これがスキャナ(1スキャン軸)のみを介して、ここでは規範的にY方向へ対象物の上へ導かれることによって、線状に走査するレーザー走査顕微鏡が実現できることを示す。図2で点形のピンホールを、2次元切り替え鏡アレーDMD1によって実現し暗鏡に基づいて帯形に表された線形のレーザー光に沿ったスリットピンホールで置き換え、検出器を(感度増強した)CCDで置き換えると、システムは線状に走査するモードで運用できる。DMDアレーの1つの次元内に走査線が形成され、他の座標軸にこの対象物の線のスペクトルが形成される。

【図面の簡単な説明】

【図1】顕微鏡ユニットMと走査中枢S

【図2】走査光程外に検出部を有する別の実施例

【図3】励起に対応する反射像光路

【図4】切り替え鏡アレーDMD1による共焦点絞り

【図5】湾曲した格子GT3の使用例

【図6】格子に代えプリズムPを置き換えた例

【図7】従来顕微鏡への適用例

【図8】多光子蛍光を励起する場合

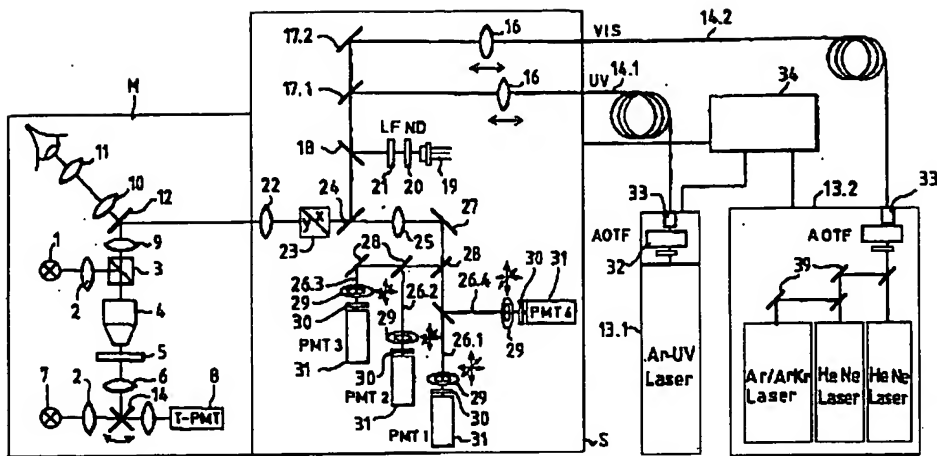
【図9】LCDアレーを用いた場合

【図10】Yスキャンのみによる走査

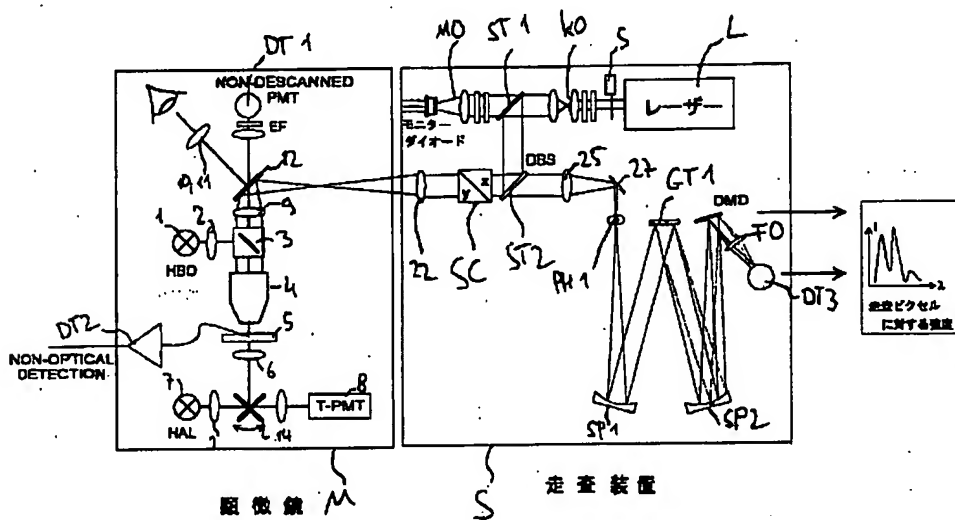
【符号の説明】

- 1 光源
- 2 照明レンズ系
- 3 ビームスプリッター
- 4 対物レンズ
- 5 試料ステージ
- 6 集光レンズ
- 7 光源
- 8 受信機の配列
- 9 円筒レンズ
- 10 円筒レンズ
- 11 接眼レンズ
- 12 ビームスプリッター・鏡
- 13.1, 13.2 レーザーモジュール
- 14.1, 14.2 単一モード光ファイバー
- 16 視準レンズ系
- 17.1, 17.2 光線偏向素子
- 18 部分透過鏡
- 19 モニターダイオード
- 20 ニュートラルフィルター
- 21 直線フィルター
- 22 走査対物レンズ
- 23 X/Yスキャナー
- 24 主ビームスプリッター
- 25 結像レンズ系
- 26.1-26.4 検出チャンネル
- 27 偏向プリズム
- 28 ダイクロイック・ビームスプリッター
- 29 ピンホール
- 30 放出フィルター
- 31 受信素子(PMT)
- 34 駆動ユニット・計算ユニット
- S 走査中枢
- s シャッター
- KO 視準レンズ系
- MO モニター光程
- ST1, ST2 ビームスプリッター
- SC 走査手段
- SP1, SP2 結像鏡
- DMD1 切り替え鏡アレー
- FO 収束レンズ系
- DT3 検出器
- DBS 主ビームスプリッター
- FL1 視野レンズ

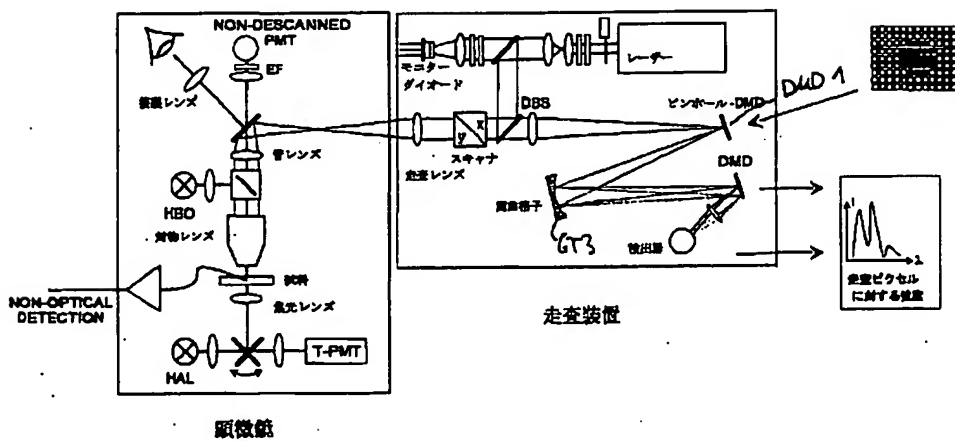
【図1】



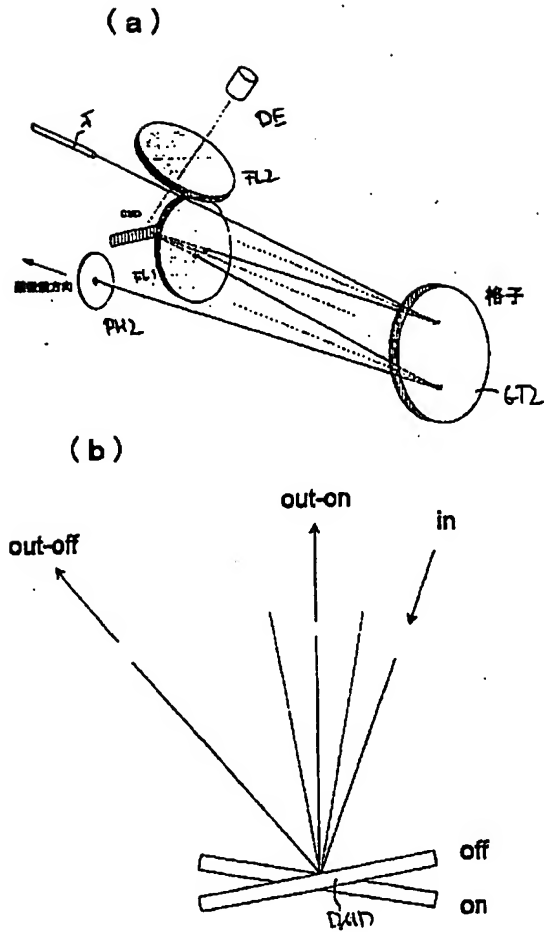
【図2】



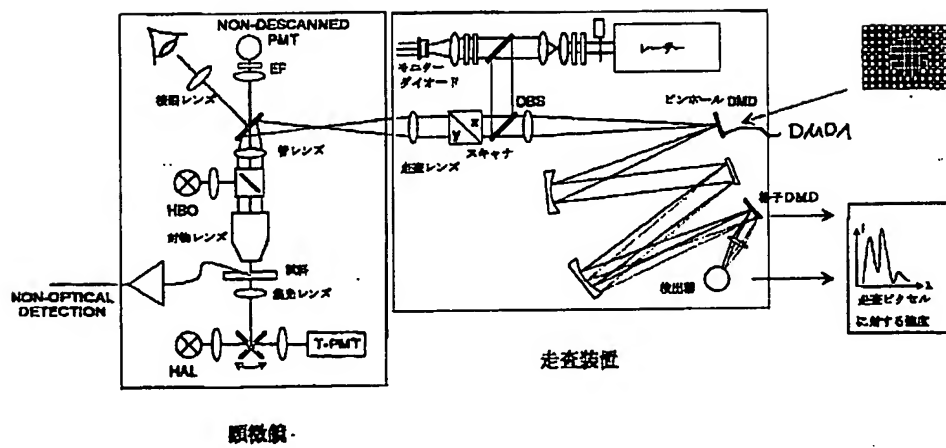
【図5】



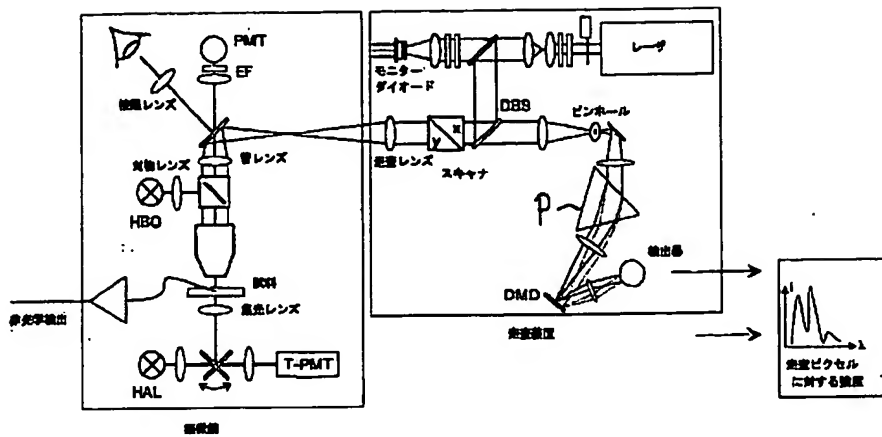
【図3】



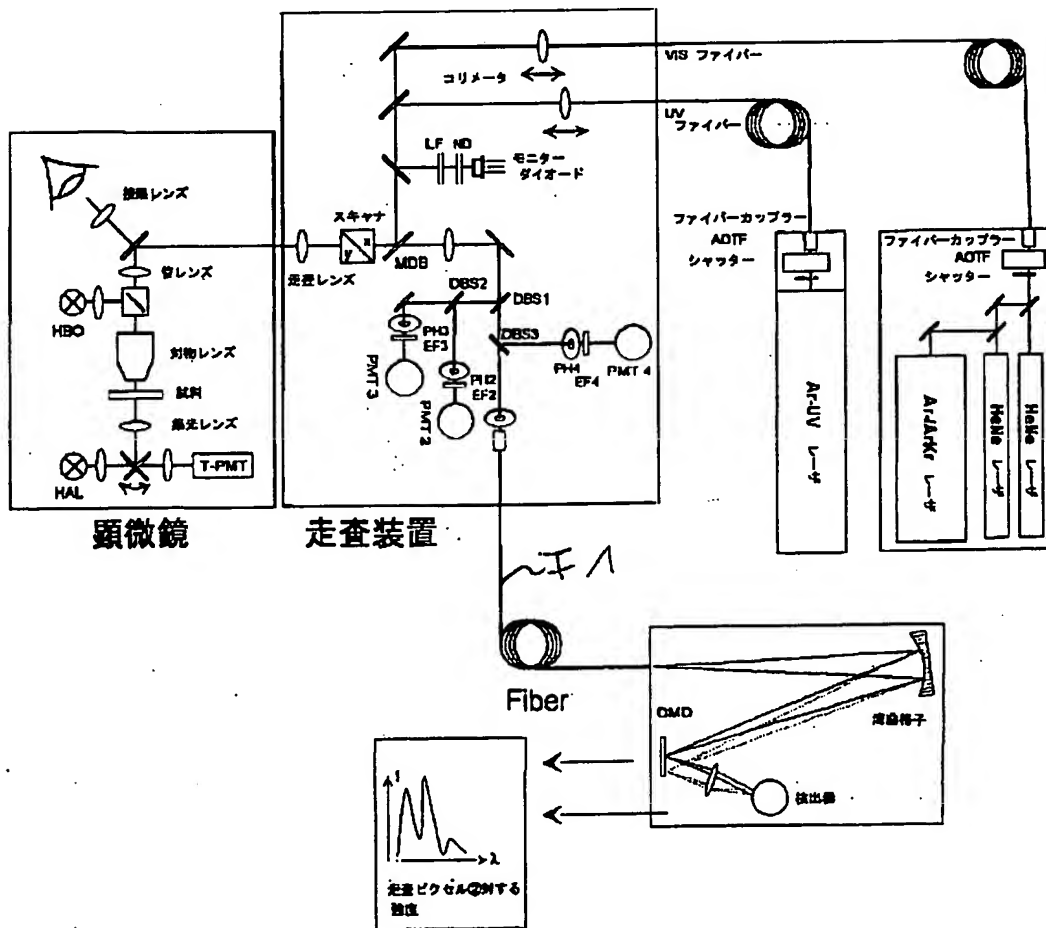
【図4】



【图6】



【图7】



NON-DESCANNED PMT

EF

検出レンズ

対物レンズ

HBO

管レンズ

試料

集光レンズ

HAL

T-PMT

顕微鏡

走査装置

モニターダイオード

スキャナ

DBS

電子

DMD

検出器

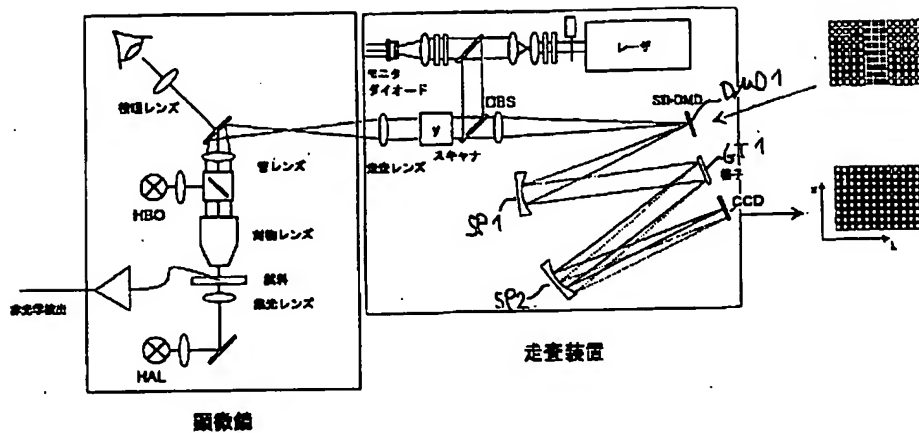
強度

λ

走査ビクセルに対する強度

[illegible]

【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 トーマス ヴェイ (原語表記) Thomas Weyh
ドイツ国 D-07646 スタッツローダ
ジュリアス・クニーゼ・ストラッセ 14
(原語表記) Julius-Kniese-Str. 14, D-07646 Stadtroda, Germany

(72)発明者 ウルリッヒ サイモン (原語表記) Ulrich Simon
ドイツ国 D-07751 ローテンスタイン
ブルグストラッセ 35 (原語表記) Burgstr. 35, D-07751 Rothenstein, Germany

(72)発明者 ギュンター シェツペ (原語表記) Guenter Schoeppe
ドイツ国 D-07745 イエナ ハンス・アイスラー・ストラッセ 24 (原語表記) Hans-Eisler-Str. 24, D-07745 Jena, Germany

(72)発明者 ステファン ウイルヘルム (原語表記) Stefan Wilherumu
ドイツ国 D-99510 シェッテン アンデル プロムナーデ 3 (原語表記) An der Promenade 3, D-99510 Schoeten, Germany

(72)発明者 ミカエル ストック (原語表記) Michael Stock
ドイツ国 D-99510 アポルダ エルフテル ストラッセ 32 (原語表記) Erfurter Str. 32, D-99510 Apolda, Germany